In the name of Allah, the Most Gracious, the Most Merciful













UNIVERSITE D'ALGER FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE MÉDECINE DENTAIRE ZIANIA

LES OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

DR H.YAHIA PR R.BOUDIAF

PLAN DU COURS

I/INTRODUCTION

II/ ENZYMES DE RESTRICTION

III/ADN POLYMÉRASES

IV/LES LIGASES

V/ LES VECTEURS

VI/ LES SONDES NUCLÉIQUES

VII/ LES TECHNIQUES

- A/ TECHNIQUE D'ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE
- B/SOUTHERN BLOT
- C/TECHNIQUE PCR
- D/TECHNIQUE DE SÉQUENÇAGE

INTRODUCTION

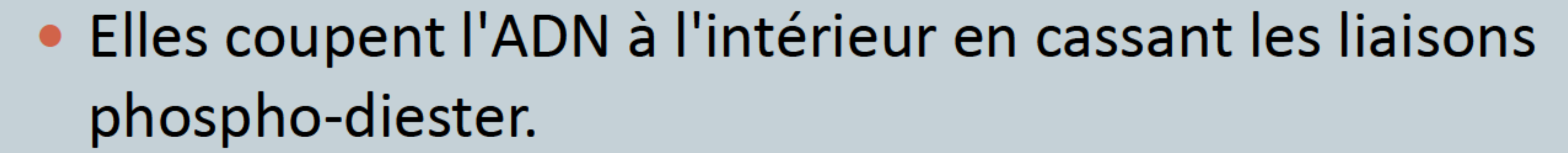
- La biologie moléculaire consiste à étudier la structure des gènes, leur expression et le
- contrôle de leur expression.
- Elle conduit donc à travailler essentiellement avec des molécules d'ADN, et d'ARNm.
- Les techniques d'étude de l'ADN sont devenues si performantes qu'il est actuellement courant d'isoler le segment d'ADN correspondant à n'importe quel gène spécifique.

III/ ENZYMES DE RESTRICTION

- Les enzymes de restriction sont capables de reconnaître spécifiquement une courte séquence d’ADN , de 4 à 10pb,
- et de cliver l'ADN au site reconnu.

- Ils permettent de fragmenter l'ADN en segments de taille réduite, ou de le couper à tel ou tel site désiré.

LES ENDONUCLÉASES:



- Elles coupent l'ADN à l'intérieur en cassant les liaisons phospho-diester.
- coupent au niveau de sites spécifiques appelés « **sites de restrictions** »,
- ces sites sont de **nature palindromique:**

la lecture des deux brins complémentaires dans **des sens opposés donne la même séquence**.

On observe deux types de coupures par les enzymes de restriction

- coupure donnant des « extrémités franches » : la coupure d’une molécule d’ADN peut se faire au milieu du palindrome ;
- coupure donnant des « extrémités adhésives » (ou « bouts collants ») ;
- d’autres types d’enzymes agissent en coupant de part et d’autre du centre de symétrie.

LES SEQUENCES RECONNUES (Type II)

→ courtes (4 - 6 pb +++), palindromiques

COUPURES A BOUTS COHESIFS Ex : EcoR I

5 '......G A A T T C ....3 ' 5 '....... G AATTC......3 '
3 '......C T T A A G.......5 ' 3 '........ CTTAA G......5 '

COUPURES A BOUTS FRANCS (BLUNT ENDS) ex : Sma I

5 ' ....C C C G G G ....3 ' 5 ' ....C C C G G G ....3 '
3 ' ....G G G C C C ....5 ' 3 ' ....G G G C C C ....5 '

Tableau 1: exemple de quelques exo nucléase et leurs origines

Enzyme	microorganisme	SITE DE RESTRICTION
EcoRI	*Echerichia coli*	↓ GAATTC CTTAAG ↑
Eco RII	*Echerichia coli*	↓ GCCTGGC CGGACCG ↑
PstI	*Providentia stuartii*	↓ CTGCAG GACGTC ↑
HindIII	*Haemophilus influenzae*	↓ AAGCTT TTCGAA ↑

Il existe trois types d'enzymes de restriction.

Les enzymes de type I et III ne sont pas utilisées en pratique, car elles coupent l'ADN de façon aléatoire.

Les enzymes de restriction de type II, clivent spécifiquement les deux brins d'ADN au niveau d'une séquence bien définie. Elles ont la particularité de reconnaitre et de couper des **séquences palindromiques**

IV/ADN polymérases
Les enzymes qui « recopient » un acide nucléique

- La copie d'une chaine d'acides nucléiques, qu'il s'agisse de synthétiser une chaine d'ADN ou d'ARN, s'effectue de manière complémentaire et antiparallèle (l'addition des nouveaux nucléotides se faisant dans le
- sens 5'phosphate vers 3' OH).
- Elles réalisent des liaisons phospho-diester entre deux nucléotides adjacents.

Les ADN polymérases thermorésistantes

- **Taq polymérase :**

extraite à partir d'une bactérie Thermus aquaticus , Active à 70°C, utilisée dans la technique PCR, en vue d'une amplification de l'ADN in vitro.

V/LES LIGASES

Les enzymes qui ligaturent

- Elles réalisent des liaisons phospho-diester, pour souder deux segments d'ADN.

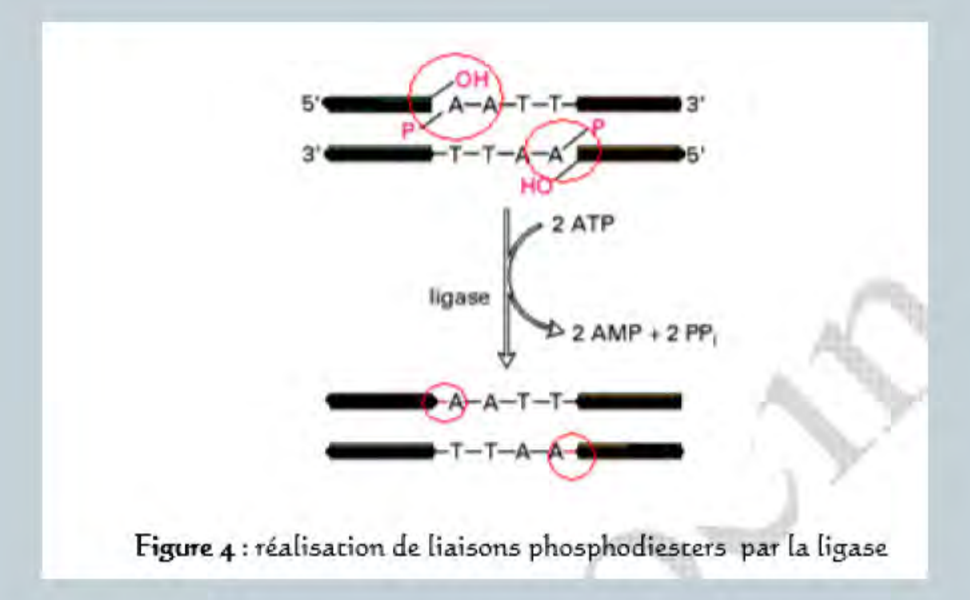


Figure 4 : réalisation de liaisons phosphodiesters par la ligase

VI/ Les vecteurs



- Les vecteurs sont des petites molécules d'ADN dans lesquels on insère le fragment d'ADN à étudier.
- Ces petits ADN sont généralement des plasmides ou des bactériophages.
- Il est nécessaire d'introduire ces bactériophages ou plasmides dans les bactéries pour réaliser une multiplication de ceux-ci.

Vecteur de clonage

Vecteur qui renferme une origine de réplication Ori V

il permet de cloner un segment d'ADN ou un gène qui y est intégré.



Figure 5 : vecteur de clonage

Vecteur d'expression :

Renferme un promoteur, il permet de faire exprimer un gène

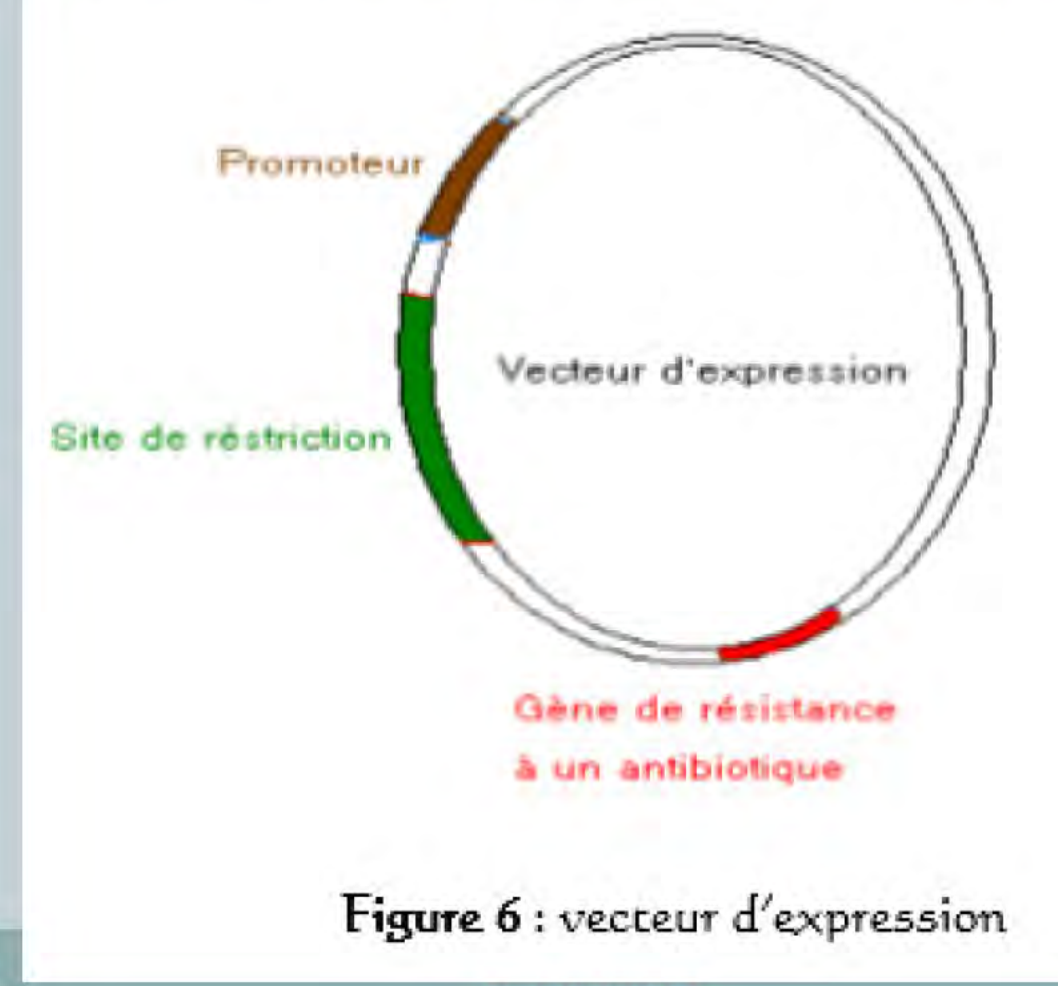


Figure 6 : vecteur d'expression

VI/ Les sondes nucléiques



Une **sonde nucléique** = Séquence d'ADN ou d'ARN marquée (par un composé fluorescent, un radioisotope, ou une enzyme) que l'on utilise pour détecter des séquences homologues (complémentaires) par hybridation *in situ* ou *in vitro*.



- Séquence **d'ADN monocaténaire**, marquée, complémentaire du gène recherché, son rôle est la **détection de gènes,** notamment **en diagnostic génétique**.

- Le principe consiste à **détecter la présence d'une mutation** ponctuelle en réalisant l'hybridation moléculaire entre la séquence à tester et la sonde de l'allèle muté, L'utilisation d'une sonde spécifique de l'allèle normal et nécessaire pour réaliser un témoin négatif.

VIII/ LES TECHNIQUES

A/ TECHNIQUE D'ÉLECTROPHORÈSE
B/SOUTHERN BLOT
C/TECHNIQUE PCR
D/TECHNIQUE DE SÉQUENÇAGE

A/ Technique d'électrophorèse sur gel d'agarose

- Définitions :Technique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique.

On peut ainsi analyser et purifier dans un milieu gélifié (gel d'agarose, gel de polyacrylamide...) l'ADN, l'ARN, les protéines.



L’ADN génomique est fragmenté par une enzyme de restriction.

- Le produit de la digestion est ensuite migré sur le gel d’agarose par électrophorèse afin de séparer les fragments de restriction en fonction de leurs poids moléculaires

ADN coloré au bromure d'ethidium

limite du colorant bleu anionique

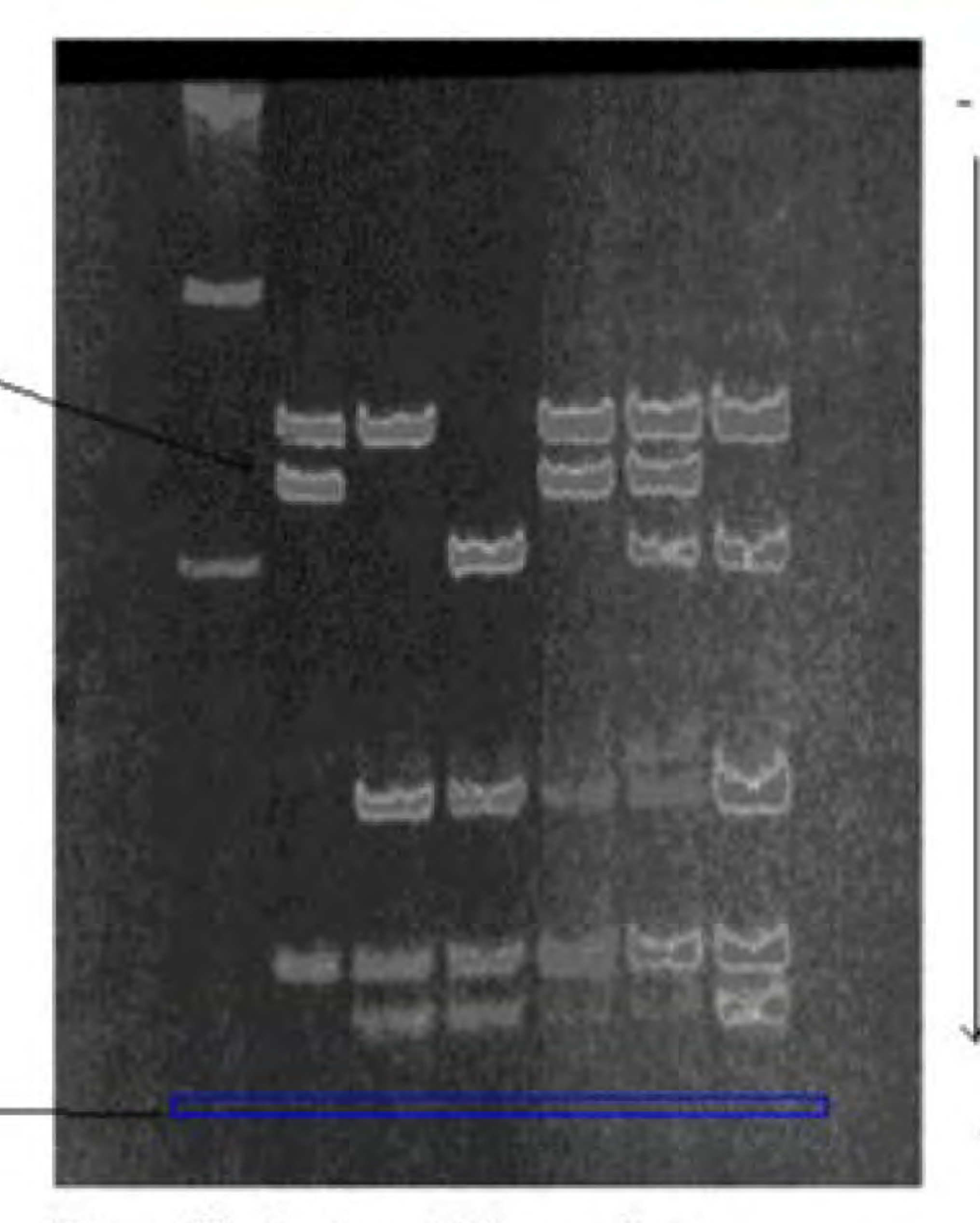


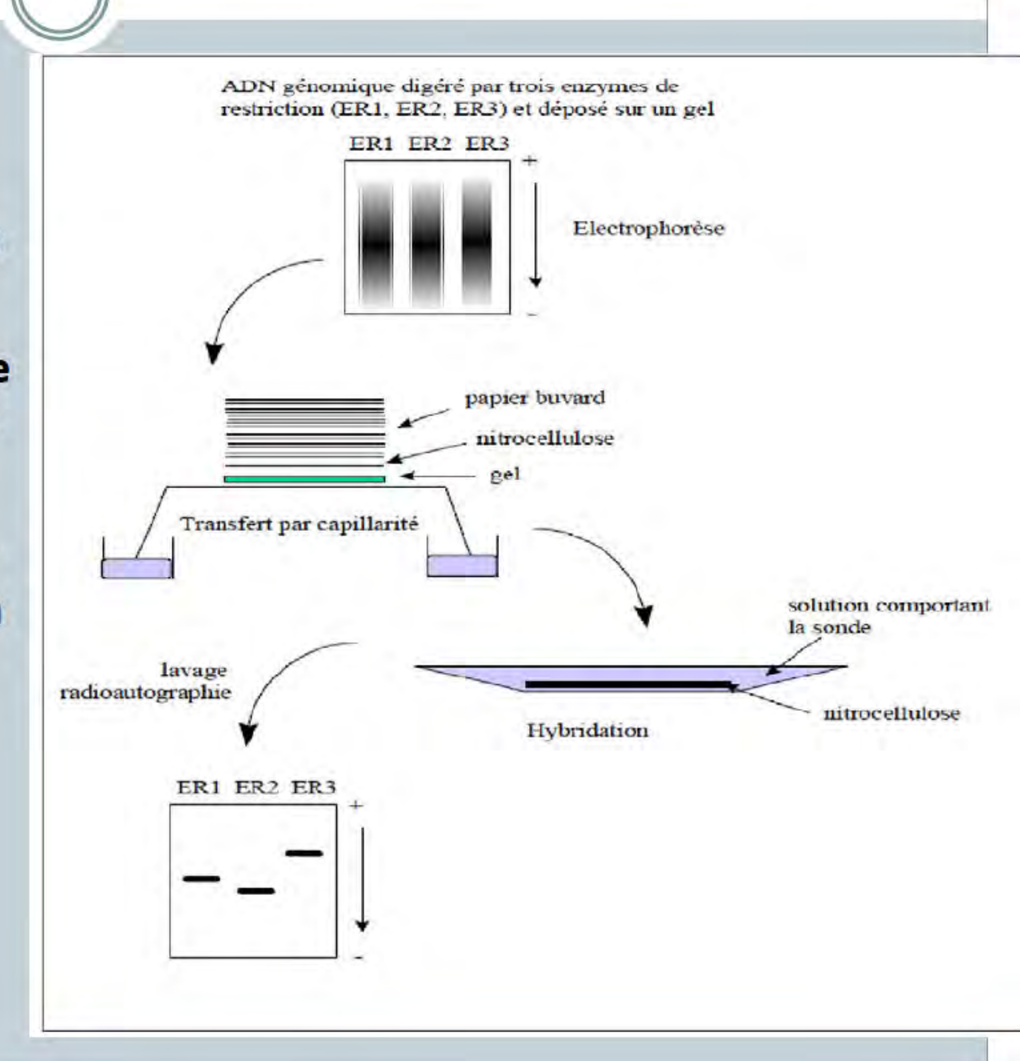
Fig.7 : Technique d'électrophorèse

B/ Southern blot

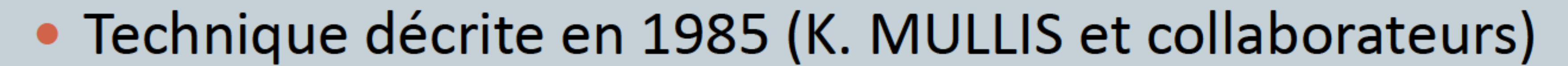
- Cette méthode a été initialement décrite par E.M. Southern en 1975.
- Elle consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à une sonde (des séquences complémentaires marquées par radioisotope.)

Étapes successives de cette technique

- 1-clivage enzymatique de restriction
- 2- électrophorèse sur gel d'agarose
- 3- dénaturation dans le gel des fragments de restriction
- 4- transfert sur support solide (membrane de nylon ou nitrocellulose) par capillarité (buvardage)
- 5- fixation de l'ADN sur la membrane par cuisson (mb. nitrocellulose) ou exposition U.V (mb.nylon)
- 6- hybridation avec une sonde marquée dénaturée
- 7- lavages
- 8- autoradiographie

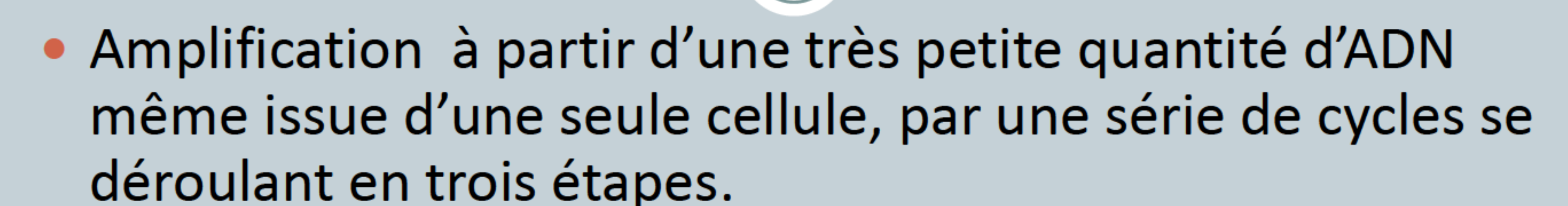


C/Technique PCR



- Technique décrite en 1985 (K. MULLIS et collaborateurs)
- permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement.
- Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier.

PCR



- Amplification à partir d'une très petite quantité d'ADN même issue d'une seule cellule, par une série de cycles se déroulant en trois étapes.

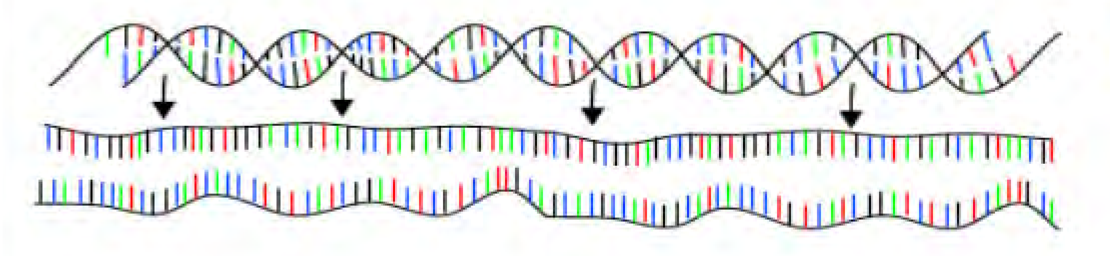
  - Dénaturation : l'ADN à amplifier est dénaturé à la chaleur, les deux brins se séparent et servent de matrice.

  -Hybridation des amorces: on baisse la température pour permettre à l'amorce de s'hybrider spécifiquement aux extrémités de la séquence cible à amplifier.

  -Elongation ou polymérisation à 70°C: à cette température optimale de l'activité de l'enzyme Taq polymérase, l'amorce est allongée par complémentarité au brin matrice, ce qui produit deux nouvelles molécules d'ADN.

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

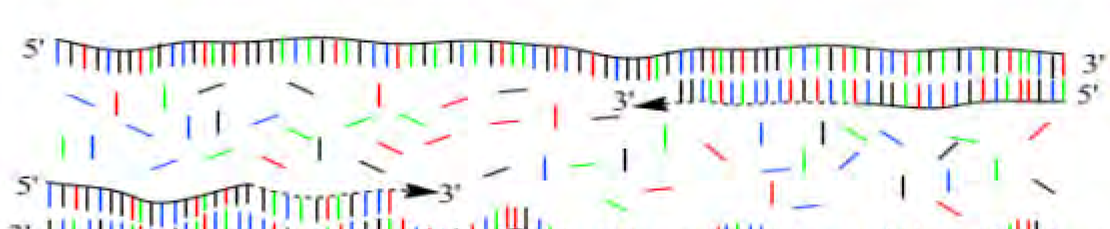
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)



- Le nombre de molécule obtenu après n cycles et 2n
- Cette technique permet entre autres de
- détecter la présence du virus VIH ou de mesurer la charge virale (concentration du virus dans
- le plasma), des OGM (organismes génétiquement modifiés), des virus des hépatites B, C et D.
- De plus en plus utilisée en criminalistique

D/ Technique de séquençage

Technique qui permet de déterminer la séquence d'ADN en réalisant une série de réplication



De ce fait la technique nécessite

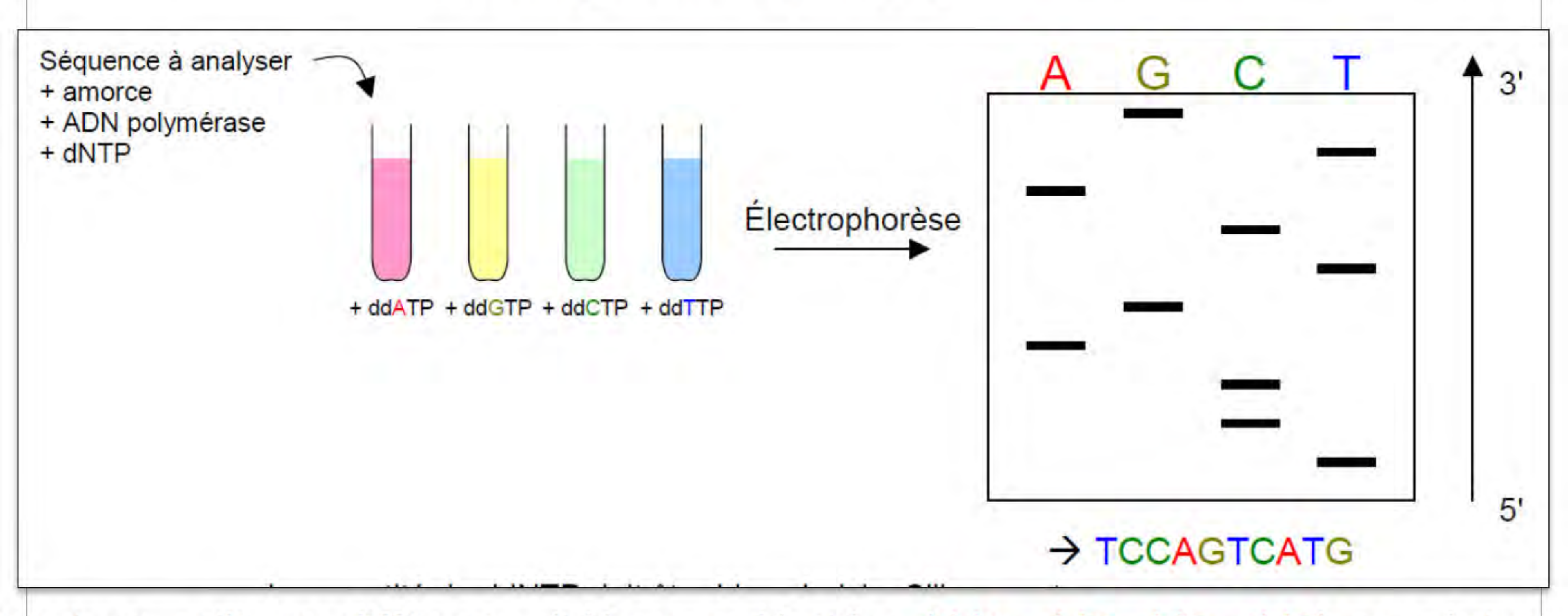
- 4 synthèses du brin complémentaire
- des amorces d'où les synthèses débutent
- **ADNs polymérase I** : catalyse la synthèse
- **Nucléosides triphosphate** (+ Mg^{2+}) : dATP , dCTP , dGTP et Dttp
- **Didésoyribonucléoside** triphosphate marqué (radioactivité) :

dd ATP, ddCTP ddGTP, et ddTTP:

Ne possèdent pas de groupement OH en 2' ni en 3',

Ils bloquent donc la synthèse lorsqu'ils sont incorporés au brin.

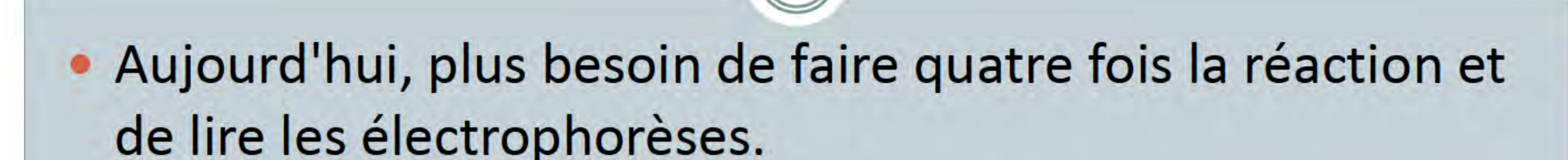
Technique de séquençage



Ainsi on utilisant différents didésoxynucléotides (ddA, ddT, ddG, ddC) on obtient plusieurs fragments se terminant chacun par l'un des didé-soxynucléotides.

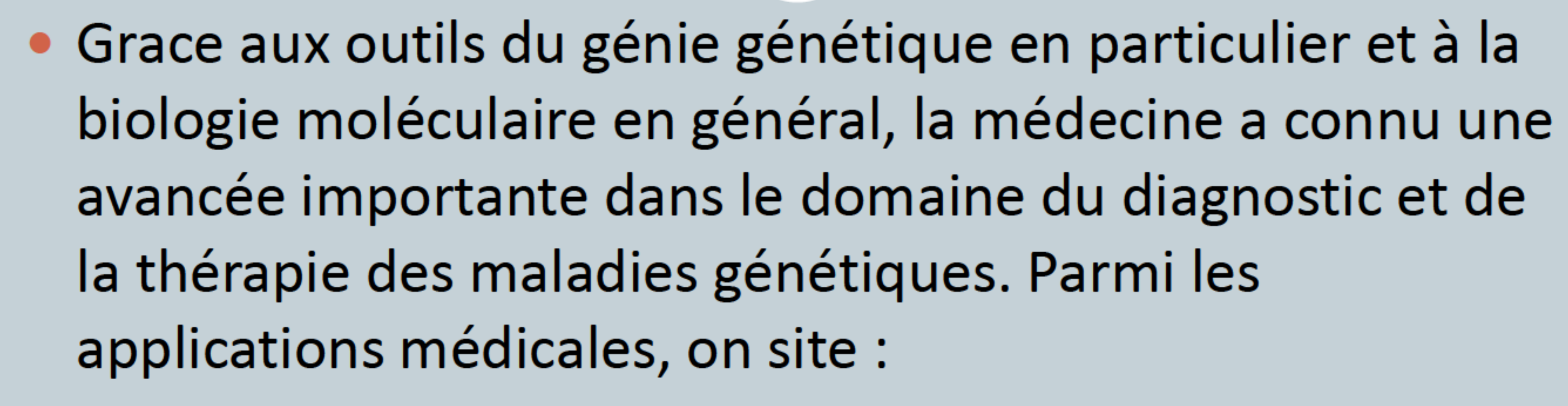
Après séparation des brins néo synthétisés et leur migration sur gel d'électrophorèse, chaque fragment indique la position d'une base au niveau du brin néosynthétisé (brin lu) dont l'ordre est donné par sa position sur le gèle d'électrophorèse

Méthode automatique



- Aujourd'hui, plus besoin de faire quatre fois la réaction et de lire les électrophorèses.
- La machine le fait automatiquement.

V-Applications



- Grace aux outils du génie génétique en particulier et à la biologie moléculaire en général, la médecine a connu une avancée importante dans le domaine du diagnostic et de la thérapie des maladies génétiques. Parmi les applications médicales, on site :
- Diagnostic génétique (prés symptomatique, prés natal etc.)
- Thérapie génique (correction d'un gène au niveau des cellules souches)
- Synthèse de molécules thérapeutiques